·论著·

司美格鲁肽在蛋氨酸胆碱缺乏饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏脂质代谢中的研究

张全爱[1]，李沙[2]，王恺悌[3]，董慧聪[1]，卢晓飞[1]，郭永泽[4*]

1.056004 河北省邯郸市，河北工程大学临床医学院
2.056004 河北省邯郸市，河北工程大学医学院
3.830000 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市，新疆医科大学
4.056004 河北省邯郸市，河北工程大学附属医院消化科
*通信作者：郭永泽，主任医师；E-mail：guoyongze69@126.com

【摘要】 **背景** 司美格鲁肽作为胰高血糖素样肽 1 受体激动剂之一，对于缓解非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）的进展有很大的潜力但是作用机制尚未明确。**目的** 研究司美格鲁肽对肝脏脂质代谢的影响，进一步探究非酒精性脂肪性肝病的发病机制及帮助临床做出诊断和治疗。**方法** 2022 年 9—11 月 30 只 SPF 级 5~8 周龄雄性 SD 大鼠，体质量（180±20）g，大鼠适应性喂养 1 周后随机分为空白组、模型组和干预组，每组 10 只。制备 NAFLD 大鼠模型，干预组大鼠给予司美格鲁肽 40 μg/kg，溶解于 0.9% 氯化钠溶液皮下注射，空白组和模型组大鼠皮下注射等量 0.9% 氯化钠溶液。观察大鼠一般情况，苏木素－伊红（HE）染色和油红 O 染色观察大鼠肝组织病变情况，检测大鼠血清丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）水平，检测大鼠肝组织三酰甘油（TG）水平。反转录聚合酶链反应（RT-PCR）检测脂肪酸合成酶（FAS）、乙酰辅酶 A 羧化酶（ACC1）、肉毒碱棕榈酰转移酶 1α（CPT1α）、乙酰辅酶 A 氧化酶（AOX）、脂肪酸转运蛋白 36（FAT/CD36）、肝脏脂肪酸结合蛋白（LFABP）、载脂蛋白 B（ApoB）、微粒体甘油三酯转移蛋白（MTTP）mRNA 表达量。蛋白质印迹试验（Western blot）检测 FAT/CD36 蛋白含量。**结果** 实验期间各组动物均无死亡，空白组大鼠毛发柔顺、有光泽、精神状态良好，模型组和干预组大鼠随喂养时间增长，表现为体质量明显减轻，毛发紊乱、无光泽，活动减弱，精神萎靡。干预结束后模型组体质量低于空白组，干预组高于模型组（$P<0.05$）。模型组肝脏质量高于空白组，干预组低于模型组（$P<0.05$）。模型组 ALT、AST、TG 水平高于空白组，干预组 ALT、AST、TG 水平低于模型组（$P<0.05$）。模型组 CPT1α、AOX、LFABP、ApoB、MTTP 低于空白组，干预组 FAT/CD36 低于模型组（$P<0.05$）。模型组 FAT/CD36 高于空白组，干预组低于模型组（$P<0.05$）。**结论** 司美格鲁肽缓解了 NAFLD 大鼠肝脏的脂质沉积，这可能与 FAT/CD36 蛋白表达下调有关。

【关键词】 非酒精性脂肪性肝病；司美格鲁肽；脂质代谢；脂肪酸转运蛋白 36
【中图分类号】 R 575.5 【文献标识码】 A DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0534

Effect of Semaglutide in Hepatic Lipid Metabolism of Rats in a Methionine-choline Deficient Diet-induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Model

ZHANG Quanai[1]，*LI Sha*[2]，*WANG Kaiti*[3]，*DONG Huicong*[1]，*LU Xiaofei*[1]，*GUO Yongze*[4*]
1.School of Clinical Medicine，the Hebei University of Engineering，Handan 056000，China；
2.School of Medicine，Hebei University of Technology；Handan 056000，China；
3.Xinjiang Medical University，Urumqi 830000，China
4.Department of Gastroenterology，Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering，Handan 056000，China
**Corresponding author：GUO Yongze，Chief physician；E-mail：guoyongze69@126.com*

【Abstract】 **Background** Semaglutide，as one of the glucagon-like peptide-1（GLP-1）receptor agonists，has significant potential for alleviating the progression of non-alcoholic fatty liver disease（NAFLD）. However，its mechanism of

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81800549）；河北省自然科学基金资助项目（H2020402002）
引用本文：张全爱，李沙，王恺悌，等 . 司美格鲁肽在蛋氨酸胆碱缺乏饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏脂质代谢中的研究［J］. 中国全科医学，2023.［Epub ahead of print］. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0534.［www.chinagp.net］
ZHANG Q A，LI S，WANG K T，et al. Effect of semaglutide in hepatic lipid metabolism of rats in a methionine-choline deficient diet-induced non-Alcoholic fatty liver disease model［J］. Chinese General Practice，2023.［Epub ahead of print］.

action remains unclear. **Objective** To investigate the effect of semaglutide on hepatic lipid metabolism, further explore the pathogenesis of NAFLD and help clinical diagnosis and treatment. **Methods** Between September and November 2022, 30 SPF-grade male SD rats, aged 5-8 weeks with a body weight of (180 ± 20) g, were acclimatized for one week and then randomly divided into three groups of control, model, and intervention, with 10 rats in each. The NAFLD rat model was prepared, and the intervention group received semaglutide at 40 μg/kg dissolved in 0.9% saline solution subcutaneously. The control and model groups received an equivalent volume of 0.9% saline subcutaneously. The general condition of the rats was observed, with hematoxylin-eosin (HE) staining and Oil Red O staining to examine liver tissue lesions. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and liver tissue triglyceride (TG) levels were measured. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect mRNA expression of fatty acid synthase (FAS), acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1), carnitine palmitoyltransferase 1α (CPT1α), acyl-CoA oxidase (AOX), fatty acid transport protein 36 (FAT/CD36), liver fatty acid-binding protein (LFABP), apolipoprotein B (ApoB), and microsomal triglyceride transfer protein (MTTP). Western blot assay was used to detect FAT/CD36 protein levels. **Results** There was no death of animals in all groups during the experimental period, and the rats in the control group exhibited smooth and glossy fur with good spirit, while the rats in the model group and intervention group showed a significant reduction in body weight, disorganized and lusterless hair, reduced activity and depressed spirit with the increase in feeding time. The body weight of the model group was lower than that of the control group at the end of the intervention, and the intervention group was higher than that of the model group (P<0.05). The liver weight of the model group was higher than the control group, and lower in the intervention group (P<0.05). The levels of ALT, AST, and TG were higher than those in the model group than in the control group, and lower in the intervention group (P<0.05). The levels of CPT1α, AOX, LFABP, ApoB, and MTTP were lower in the model group than in the control group, and the level of FAT/CD36 was lower in the intervention group (P<0.05). The model group had higher levels of FAT/CD36 than the control group, and the intervention group had lower levels than the model group (P<0.05). **Conclusion** Semaglutide alleviated hepatic lipid deposition in NAFLD rats, potentially related to the downregulation of FAT/CD36 protein expression.

【Key words】 Nonalcoholic fatty liver disease; Semaglutide; Lipid metabolism; Fatty acid translocase36

非酒精性脂肪性肝病（nonalcoholic fatty liver disease，NAFLD）2020年更名为代谢相关性脂肪肝疾病（metabolic associated fatty liver disease，MAFLD）[1-2]，是指通过组织学或高质量影像学检查确认的除外过量饮酒以及其他明确病因所导致的肝细胞发生5%以上的脂肪病变[3]。非酒精性脂肪肝（nonalcoholic fatty liver，NAFL）是该病的早期阶段[4]，最新流行病学调查显示全球有17亿NAFLD患者[5]，并且以每年120万的速度增长[6]。随着生活水平提高和病毒性肝炎研究的不断深入，NAFLD已取代替病毒性肝炎成为临床上最常见的慢性肝病[7]。研究发现全球约40%的NAFLD病人BMI并未达到肥胖标准，甚至有19.2%患者BMI在正常范围[8-9]。如果不积极进行及时的干预，将会导致脂肪型肝炎（NASH）、肝硬化、甚至肝细胞癌[10]。尽管NAFLD的发病机制研究、治疗靶标的确定和药物开发的推进取得了长足进展，但仍面临着重大挑战，目前尚无批准用于该疾病的药物，这将给家庭以及医疗带来巨大经济损失，对人类健康构成严重威胁[11]。

胰高血糖素样肽1（glucagon-likepeptide1，GLP-1）是一种小肠L细胞由进食刺激分泌的小分子肽物质[12]，其可根据患者的血糖水平影响胰岛β细胞分泌胰岛素以及胰岛α细胞分泌胰高血糖素[13]，进而控制人体血糖水平的动态平衡，另外还可以降血脂[14]、改善胰岛素抵抗、肝功能、肝脏氧化应激和炎症损伤，通过调控其水平可使心血管获益[15]。司美格鲁肽是第二代GLP-1类似物，与GLP-1有94%的同源性，半衰期为7 d[16]，生物利用度为89%。研究表明，司美格鲁肽治疗可显著改善患有NAFL的糖尿病患者的肝脏组织学和肝酶水平[17]，因此司美格鲁肽具有治疗NAFLD的潜力，然而司美格鲁肽对非糖尿病患者肝脏脂质沉积的作用机制尚不清楚[18]。本研究通过饲喂蛋氨酸胆碱缺乏（methionine-choline-deficient diet，MCD）饲料建立早期NAFLD大鼠的疾病模型，该模型符合临床中非糖尿病且BMI正常的NAFLD患者群体，通过检测空白组、模型组及干预组中脂质合成、β氧化、转运以及脂肪酸摄取途中关键酶的含量变化水平，探讨司美格鲁肽能否缓解NAFLD的发生、发展以及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 研究时间：2022年9—11月。

1.1.2 实验动物：30只SPF级5~8周龄雄性SD大鼠，体质量（180±20）g，购自北京维通利华实验动物公司（质量合格证编号：NO.110011220108748131）。在河北工程大学临床医学院中心实验室动物房喂养，环境温

度 20~22° C，相对室内湿度 50%，饲养期间自由摄食、饮水。本研究获得河北工程大学附属医院伦理委员会批准（审核编号：IACUC-Hebeu-2023-0008）。

1.1.3 主要仪器设备：Sigma 3-30KS 离心机（北京五洲东方科技发展有限公司）、DYY-6C 型电泳仪（北京六一生物科技有限公司）、SCILOGEX 摇床（上海雅科生物科技有限公司）、高通量冷冻冷冻研磨仪（宁波新艺超声设备有限公司 Xinyi-24N）、实时荧光 PCR 仪器（赛默飞世尔科技公司）、-80 ℃冰箱（青岛海尔公司）、iMark 酶标仪（美国伯腾仪器有限公司）、显影仪（cytiva）。

1.1.4 主要试剂：司美格鲁肽注射液购自丹麦诺和诺德公司（批号：202202ASS1）；0.9% 氯化钠溶液购自石家庄四药有限公司（生产批号：2207012002）；蛋白提取试剂盒（雅酶公司，批号：016C2020）高纯总 RNA 快速提取试剂盒（北京百泰克生物技术有限公司，批号：B021007022）、逆转录试剂盒（赛默飞世尔科技有限公司（批号：91254516）、qPCR SuperMix 试剂盒（北京全式金有限公司（批号：P41013）；丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、三酰甘油（TG）含量检测试剂盒（南京建成生物工程研究所（批号：20221014、20221015、20221017）；脂肪酸转运蛋白 36（FAT/CD36）ab133922 抗体（美国 abcam 有限公司，批号：1002656-13）。

1.2 实验方法

1.2.1 NAFLD 大鼠模型制备：大鼠适应性喂养 1 周后随机分为空白组、模型组和干预组，每组 10 只。空白组给予普通饲料喂养，模型组和干预组给予 MCD 饲料喂养，时间为 30 d。

1.2.2 干预方法：大鼠造模期间每 3 d 称重 1 次后进行干预，干预组大鼠给予司美格鲁肽 40 μg/kg，溶解于 0.9% 氯化钠溶液皮下注射，空白组和模型组大鼠皮下注射等量 0.9% 氯化钠溶液。

1.2.3 标本取材：大鼠干预 30 d 后禁食 6 h，二氧化碳麻醉机麻醉，抽取下腔静脉血液，置于离心管沉淀 20 min 后 4℃，3 500 rpm 离心 20 min 分离血清，取上层液体，冻存用于检测血清 AST、ALT 含量水平。肝脏拍照，观察颜色、质地，将肝脏完整取下后称重，留取部分肝组织固定液固定用于苏木素 - 伊红（HE）染色和油红 O 染色，其余肝组织置于 -80 ℃冰箱保存用于后续实验步骤。

1.2.4 组织切片染色：取固定好的肝组织，经过石蜡包埋切片、脱蜡、水化、放入苏木素染液中 5 min，自来水冲后依次放入不同浓度梯度乙醇后脱水，伊红染色后放入无水乙醇进行脱水封片，显微镜镜检，图像采集分析。油红 O 染色时将冰冻切片恢复至室温，固定 15 min 后晾干置入油红中静置过夜、背景分化、苏木素染色后在显微镜下观察结果。

1.2.5 血清 ALT、AST 水平检测：根据试剂盒绘制标准曲线，大鼠待测血清分别放入对照管和测定管，混匀孵育在酶标仪中读取吸光度值，代入标准曲线中计算 AST、ALT 水平。

1.2.6 肝组织 TG 水平检测：准确称取肝脏组织重量，按照重量（g）：体积（mL）=1 ：9 的比例加入无水乙醇，冰水浴条件下机械匀浆，2 500 r/min，离心 10 min，取上清液，根据说明书步骤操作加入蒸馏水、校准品、样本液和样本，孵育箱孵育后在 510 nm 酶标仪中读取吸光度值代入标准曲线，计算 TG 含量。

1.2.7 反转录聚合酶链反应（RT-PCR）检测脂肪酸合成酶（FAS）、乙酰辅酶 A 羧化酶（ACC1）、肉毒碱棕榈酰转移酶 1α（CPT1α）、乙酰辅酶 A 氧化酶（AOX）、脂肪酸转运蛋白 36（FAT/CD36）、肝脏脂肪酸结合蛋白（LFABP）、载脂蛋白 B（ApoB）、微粒体甘油三酯转移蛋白（MTTP）mRNA 表达量：取各组肝组织加入 1 mL 裂解液冰浴匀浆，提取总 RNA 检测浓度，引物序列见表 1。逆转录条件和方法如下。在置于冰上的无菌无核酸的 PCR 管中按顺序加入总 RNA 0.5μg，oligo（DT）18 引物 1 μL，补充无核酸酶的高纯水至 12 μL，模板和引物的混合液轻轻混匀，短暂离心，65 ℃孵育 5 min，冰上冷却，离心，在置于冰上冷却后加入 4 μL 5×Reaction Buffer、1 μL RNA 酶抑制剂、2 μL 10Mm dNTP Mix 和逆转录酶 1 μL，使总体积为 20 μL，轻轻混匀，短暂离心，42 ℃孵育 60 min，70 ℃加热 5 min 终止反应。RT-PCR 扩增条件方法如下。加入 SYBR Green Master Mix 10 μL，$dddH_2O_5$ μL、CDNA 4 μL、Primer 1 μL，95 ℃预变性 1 min、95 ℃变性 5 s、60 ℃退火延伸数据采集 15 s。共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta}$Ct 法进行数据的相对定量分析。

1.2.8 蛋白质印迹试验（Western blot）检测 FAT/CD36 蛋白含量：取各组肝组织，加入 200 μL 变性裂解液，冷冻研磨机机械匀浆后盖上纯化柱盖子室温孵育 2 min，置于 4 ℃，16 000 r/min，离心 2 min，提取总蛋白，参照试剂盒说明书进行操作，酶标仪检测蛋白质浓度，计算上样体积。采用 7.5% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺分离胶对蛋白进行电泳，放入 20 mL 脱脂奶粉中摇床封闭 1 h 后 TBST 洗膜 3 次，10 min/ 次，加入 FAT/CD36（1 ：1 000）一抗 4℃冰箱 16 h；取出后 TBST 溶液洗膜 3 次，10 min/ 次，然后加入抗兔二抗（1∶5 000），室温避光置于摇床孵育 1 h，在 TBST 溶液中洗膜 5 次，5 min/ 次，将膜放入添加超敏 ECL 试剂的避光盒子中孵育 3 min 后在自动曝光机上显影；Image J 软件对条带进行灰度分析，采用 β 肌动蛋白为内参照（β-actin），利用目的蛋白和内参照蛋白灰度值之比

来反映目的蛋白的相对表达量。

表 1 引物合成序列

Table 1 Primer synthesis sequences

基因	引物序列	引物长度（bp）
FAS	上游引物 5′-TCGAGACACATCGTTTGAGC-3′ 下游引物 5′-TCAAAAAGTGCATCCAGCAG3′	234
ACC1	上游引物 5′-GGAAGTGGAAGGCACAGTGAAGG-3′ 下游引物 5′-CTGCGGATCTGCTTGAGGACATAG-3′	159
CPT1a	上游引物 5′-CAAGTCAACGGCAGAGCAGAGG-3′ 下游引物 5′-TCATGGCGAGGCGGTACAGG-3′	80
AOX	上游引物 5′-GTGGACATCAACAGCCTGGA-3′ 下游引物 5′-AACGACCACGTAGTGGCAAT-3′	186
FAT/CD36	上游引物 5′-TGAGCCTTCACTGTCTGTTGGAAC-3′ 下游引物 5′-AGGCTGTTGAGCACACCTTGAAC-3′	117
LFABP	上游引物 5′-GTCTGCCTGAGGACCTCATCCAG-3′ 下游引物 5′-TCATGGTCTCCAGTTCGCACTCC-3′	156
ApoB	上游引物 5′-TCTGACTGGTGGACTCTGACTGC-3′ 下游引物 5′-TCTTGGAGAGCGTGGAGACTGAC-3′	176
MTTP	上游引物 5′-TTCATTCAGCACCTCCGCACTTC-3′ 下游引物 5′-AGTCCAGGATGGCTTCCAGTGAG-3′	139

注：FAS= 脂肪酸合成酶，ACC1= 乙酰辅酶 A 羧化酶，CPT1α= 肉毒碱棕榈酰转移酶 1α，AOX= 乙酰辅酶 A 氧化酶，FAT/CD36= 脂肪酸转运蛋白 36，LFABP= 肝脏脂肪酸结合蛋白，ApoB= 载脂蛋白 B，MTTP= 微粒体甘油三酯转移蛋白。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计学软件进行数据分析，符合正态分布的计量资料以（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状况

实验期间各组动物均无死亡，空白组大鼠毛发柔顺、有光泽、精神状态良好，模型组和干预组大鼠随喂养时间增长，表现为体质量明显减轻，毛发紊乱、无光泽，活动减弱，精神萎靡。干预结束后模型组体质量低于空白组，干预组高于模型组，差异有统计学意义（*P*<0.05），见表 2。

表 2 干预结束后各组大鼠体质量与肝脏质量比较结果（$\bar{x} \pm s$，g）

Table 2 Comparison of body weight and liver weight in each group after intervention

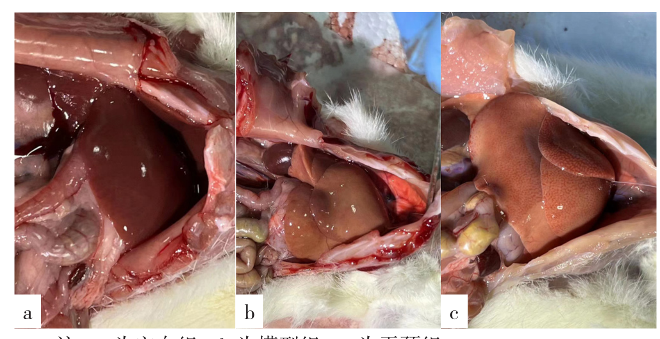
分组	只数	体质量（g）	肝脏质量（g）
空白组	10	456.98 ± 18.89	8.14 ± 1.12
模型组	10	207.58 ± 4.34[a]	14.03 ± 1.72[a]
干预组	10	213.53 ± 6.59[b]	9.39 ± 0.95[b]
F 值		869.963	56.469
P 值		<0.05	<0.05

注：[a] 表示与空白组比较 *P*<0.05，[b] 表示与模型组比较 *P*<0.05。

2.2 大鼠肝脏形态及组织学改变结果

干预结束后空白组肝脏色泽红润，质地细腻，具有韧性；模型组肝脏发白，表面明显沉积脂质颗粒，质地脆易出血；干预组的肝脏色泽和质地均明显改善。大鼠肝脏形态表现见图 1。模型组肝脏质量高于空白组，干预组低于模型组，差异有统计学意义（*P*<0.05），见表 2。

油红 O 染色结果显示，空白组肝组织结构清晰，排列整齐，未发现脂质沉积；模型组可观察到大量的红染脂滴，部分融合成片；干预组中红染脂滴数量较模型组降低。HE 染色结果显示，空白组肝细胞呈多边形结构，细胞核位于中央，胞质分布均匀，未见脂滴沉积；模型组肝细胞肿胀，可见大小不一的脂滴空泡，细胞核位于边缘，细胞边界模糊不清；干预组的脂滴空泡较模型组减少。油红 O 染色与 HE 染色结果见图 2~3。



注：a 为空白组，b 为模型组，c 为干预组。

图 1 大鼠肝脏形态表现图

Figure 1 Morphology of rat liver

2.3 大鼠血清 ALT、AST、TG 水平

3 组大鼠血清 ALT、AST 水平比较，差异有统计学意义（*P*<0.05），其中模型组 ALT、AST 水平高于空白组，干预组 ALT、AST 水平低于模型组（*P*<0.05），见表 3。

表 3 大鼠血清 ALT、AST 检测结果（$\bar{x} \pm s$，U/L）

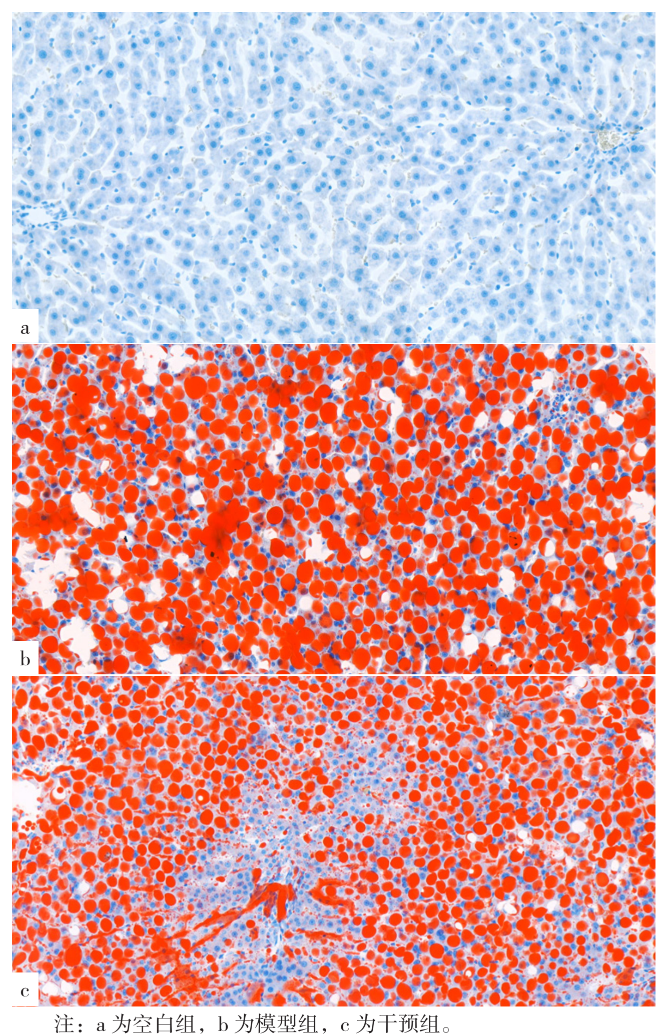
Table 3 Results of serum ALT and AST detection in rats

分组	只数	ALT（U/L）	AST（U/L）
空白组	10	49.25 ± 27.78	11.71 ± 3.80
模型组	10	131.07 ± 48.55[a]	67.46 ± 32.32[a]
干预组	10	79.57 ± 19.82[b]	33.67 ± 21.31[b]
F 值		11.30	9.89
P 值		<0.05	<0.05

注：ALT= 丙氨酸氨基转移酶，AST= 天冬氨酸氨基转移酶；[a] 表示与空白组比较 *P*<0.05，[b] 表示与模型组比较 *P*<0.05。

2.4 大鼠肝组织 TG 水平

3 组大鼠肝组织 TG 水平比较，差异有统计学意义（*P*<0.05），其中模型组高于空白组，干预组低于模型组（*P*<0.05），见表 4。



注：a 为空白组，b 为模型组，c 为干预组。
图 2 大鼠肝脏组织油红 O 染色图（×200）
Figure 2 Oil red O staining of rat liver tissue

表 4 大鼠肝组织 TG 检测结果（$\bar{x}\pm s$，μmol/g）
Table 4 Results of TG detection in rat liver tissue

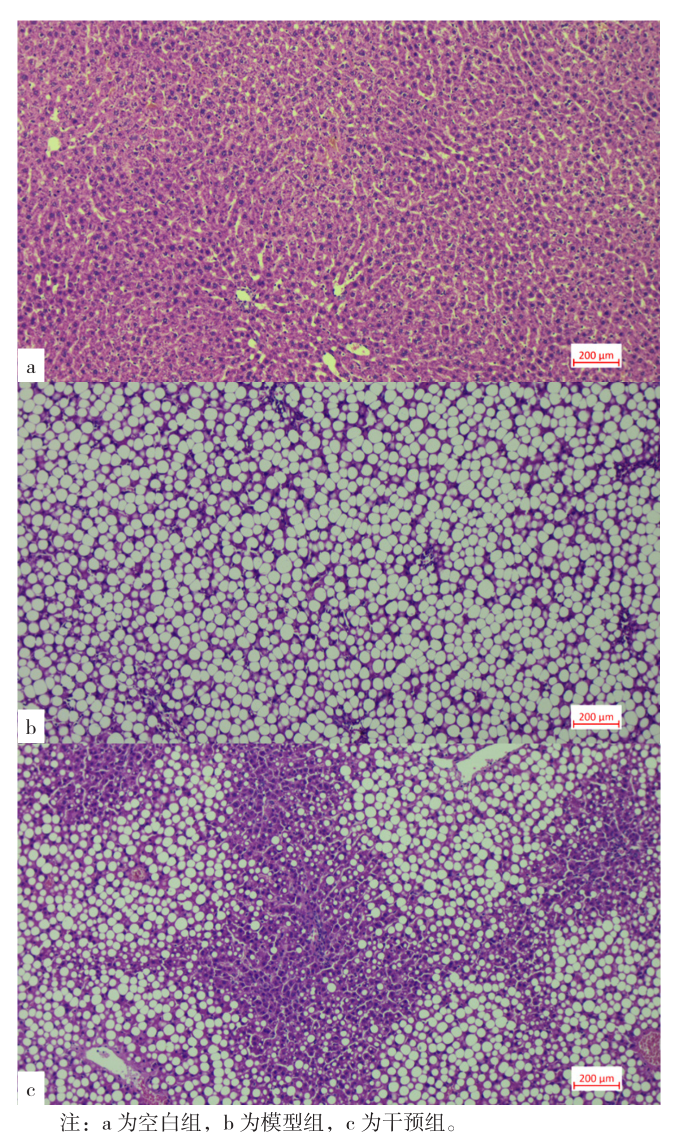
分组	只数	TG
空白组	10	4.74 ± 1.30
模型组	10	11.49 ± 2.26[a]
干预组	10	8.55 ± 2.41[b]
F 值		31.356
P 值		<0.05

注：[a] 表示与空白组比较 $P<0.05$，[b] 表示与模型组比较 $P<0.05$。

2.5 大鼠肝组织 FAS、ACC1、CPT1α、AOX、FAT/CD36、LFABP、ApoB、MTTP mRNA 表达结果

3 组大鼠肝组织 FAS、ACC1、CPT1α、AOX、FAT/CD36、LFABP、ApoB、MTTP mRNA 相对表达量比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）。模型组 CPT1α、AOX、LFABP、ApoB、MTTP 低于空白组，干预组 FAT/CD36 低于模型组（$P<0.05$），见表 5。

2.6 大鼠肝组织 FAT/CD36 表达水平



注：a 为空白组，b 为模型组，c 为干预组。
图 3 大鼠肝脏组织 HE 染色图（×200）
Figure 3 HE staining of rat liver tissue

3 组大鼠肝组织 FAT/CD36 表达水平比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），其中模型组高于空白组，干预组低于模型组（$P<0.05$），见表 6、图 4。

表 6 大鼠肝组织 FAT/CD36 表达结果（$\bar{x}\pm s$）
Table 6 Results of FAT/CD36 expression in rat liver tissue

分组	只数	FAT/CD36
空白组	4	1.00 ± 0.25
模型组	4	3.57 ± 0.33[a]
干预组	4	1.68 ± 0.41[b]
F 值		62.199
P 值		<0.05

注：FAT/CD36= 脂肪酸转运蛋白 36；[a] 表示与空白组比较 $P<0.05$，[b] 表示与模型组比较 $P<0.05$。

表 5 大鼠肝组织 FAS、ACC1、CPT1α、AOX、FAT/CD36、LFABP、ApoB、MTTP mRNA 相对表达量（$\bar{x}\pm s$）
Table 5 Relative expression of FAS，ACC1，CPT1α，AOX，FAT/CD36，LFABP，ApoB and MTTP mRNA in rat liver tissue

分组	只数	FAS［M（P_{25}，P_{75}）］	ACC1［M（P_{25}，P_{75}）］	CPT1α	AOX	FAT/CD36	LFABP	ApoB	MTTP
空白组	10	0.99（0.46，1.49）	0.95（0.38，1.69）	1.00±0.63	1.00±0.62	1.00±0.45	1.00±0.10	1.00±0.90	1.00±0.55
模型组	10	0.29（0.27，0.90）	0.23（0.21，0.27）	0.43±0.16[a]	0.32±0.09[a]	7.61±1.18[a]	0.28±0.09[a]	0.16±0.03[a]	0.41±0.28[a]
干预组	10	0.30（0.19，0.31）	0.21（0.17，0.35）	0.33±0.09	0.35±0.16	5.30±2.41[b]	0.38±0.13	0.24±0.16	0.25±0.09
F（H）值		7.73[c]	8.57[c]	6.32	7.53	27.31	79.19	5.35	8.55
P 值		0.021	0.014	0.008	0.004	<0.05	<0.05	0.015	0.002

注：[a] 表示与空白组比较 P<0.05，[b] 表示与模型组比较 P<0.05，[c] 为 H 值。



图 4 大鼠肝组织 FAT/CD36 蛋白条带图
Figure 4 FAT/CD36 protein banding in rat liver tissue

3 讨论

与多系统疾病相关的 NAFLD 正随着生活水平的提高，发病率以不同程度上升，且出现逐渐低龄化的趋势[19-20]，其增加了肝硬化、心脑血管疾病、慢性肾脏疾病以及恶性肿瘤发病和死亡风险[21]。NAFLD 的发病机制已由大多数学者所认可的“二次打击”学说过渡为“多重打击”学说，即在胰岛素抵抗、高脂饮食以及肥胖的基础上发生的脂质沉积，而后发生氧化反应和炎症的级联反应，会引起疾病的进一步发展[22]。除此之外线粒体功能异常、肠道微生物失调、细胞凋亡、炎症因子和遗传易感性也会参与进来[23]。脂质代谢紊乱是 NAFLD 发生的基础和关键[24]，维持脂质稳态主要通过 4 种代谢途径：脂肪从头合成、脂肪酸氧化、脂质摄取与以极低密度脂蛋白（VLDL）的形式释放入血，肝脏脂质的沉积和 NAFLD 的发生、发展均可由各种异常途径所致[25]。既往研究也发现当脂质代谢出现紊乱时，过量的脂肪酸会导致 FAT/CD36 对脂肪酸的吸收增加，同时 β 氧化作用也会增强[2，26]。

MCD 饲喂 4 周后可导致动物 VLDL 的合成、分泌降低及线粒体 β 氧化酶活性降低，TG 快速大量积累于肝细胞中，引起肝细胞脂肪变性而形成“第一次打击”，并使肝脏对其他损伤敏感性提高，同时也会引起肝组织出现一系列病理变化[27]。由于肝细胞发生脂肪变性，造成了线粒体对游离脂肪酸的摄入量降低，进而激发了游离脂肪酸导致线粒体对游离脂肪酸的摄入量减少，从而刺激了游离脂肪酸 β 氧化的增强，触发了氧化应激和脂质过氧化反应，最后造成了对肝脏的“第二次打击”，进而形成了 NAFLD[28-29]。相关研究显示，加用抗氧化膳食补充剂的综合精准营养干预对改善 NAFLD 患者炎性指标效果明显[30]。

司美格鲁肽是美国食品药品监督管理局（FDA）批准用于治疗 2 型糖尿病和肥胖的首个药物，其作用机制在于激活 GLP-1 受体，服用司美格鲁肽后患者腰围、血脂、血糖和血压等心脏病和糖尿病风险因素降低，整体生活质量也得到了改善[31-32]。目前国内外大量研究表明了司美格鲁肽可以治疗伴有 2 型糖尿病患者的 NAFLD[33]，但是该药是否是通过作用于减轻体质量来改善的 NAFLD 的严重程度目前尚不清楚［18，34-35］，因此研究司美格鲁肽是否可以改善 MCD 饮食诱导的 NAFLD 的脂质沉积对临床诊断以及治疗尤为重要。

FAT/CD36 属于 B 类清道夫受体[36]，在长链脂肪酸跨膜转运和调节代谢中发挥重要作用[37-39]。研究发现肝脏 FAT/CD36 表达增加会促进 NAFLD 的发展[40-41]。目前，FAT/CD36 已被广泛研究，揭示了其在调节脂质代谢方面的作用。AMP 活化蛋白激酶（AMPK）作为一种细胞能量监测器，在维持动物细胞的能量平衡和代谢过程中扮演着至关重要的角色[42]，司美格鲁肽可调节肝脏中的 AMPK 途径激活沉默信息调节因子 1（SIRT1），从而延长了动物寿命[43]。NAFLD 进展可影响 SIRT1 表达，啮齿动物 NAFLD 模型可见 SIRT1 表达降低[44]，同时有研究发现司美格鲁肽上调了 SIRT1 的表达[35]。此外 AMPK 的激活可能通过阻止雷帕霉素靶蛋白复合体 1（mTORC1）来抑制过量营养物质诱导的肝脂质积累[45]。雷帕霉素靶蛋白（mTOR）是一种非典型的蛋白激酶，可通过参与 mTORC1 复合物的信号传导途径，对基因转录和蛋白翻译产生影响[46]。研究发现 NAFLD 小鼠的 mTOR 通路被激活，进一步导致了肝脏脂肪酸转运蛋白水平的提高[47]。小鼠肝细胞经棕榈酸处理后 mTOR 信号通路表达上调，可提高肝细胞 FAT/CD36 表达水平，导致脂质积聚并引发炎症反应[48]，当使用 mTORC1 特异性抑制剂雷帕霉素处理肝细胞可导致 FAT/CD36 表达抑制[49-50]，司美格鲁肽减弱 mTOR 途径并增强肝脏中的胰岛素信号传导[43]。综上本课题组认为司美格鲁肽缓解了 MCD 饮食诱导的 NAFLD 的发生及发展可能是通过抑制 FAT/CD36 的表达来介导的。

本研究结果表明，干预组的肝组织 HE 染色、油红

O染色结果及肝脏TG水平较模型组改善，提示司美格鲁肽对缓解NAFLD的进展有缓解作用，可能与FAT/CD36蛋白表达降低有关。但是司美格鲁肽抑制FAT/CD36表达的机制仍需要进一步的研究明确，为临床使用司美格鲁肽注射液早期干预非酒精性脂肪性肝病提供实验依据。

作者贡献：张全爱提出主要研究目标，负责研究的构思与设计，研究的实施，撰写论文；张全爱、董慧聪、卢晓飞负责饲养动物，动物组织的取材；张全爱、李沙进行数据的收集与整理，王恺悌负责统计学处理，图、表的绘制与展示；郭永泽负责文章的质量控制与审查，对文章整体负责，监督管理。

本文无利益冲突

参考文献

[1] ESLAM M，NEWSOME P N，SARIN S K，et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease：an international expert consensus statement［J］. J Hepatol，2020，73（1）：202-209. DOI：10.1016/j.jhep.2020.03.039.

[2] 陈梦绮，范建高. 非酒精性脂肪性肝病相关心血管疾病的发病机制［J］. 中国动脉硬化杂志，2023，31（6）：461-465. DOI：10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.06.001.

[3] DJORDJEVIC D B，ZDRAVKOVIC M，NAGORNI A，et al. A critical approach of guideline therapeutic recommendations for NAFLD［J］. Curr Vasc Pharmacol，2018，16（3）：228-238. DOI：10.2174/1570161115666170621080228.

[4] 张夏霞. 1，25（OH）2D3对MCD饮食诱导的大鼠非酒精性脂肪肝作用的实验研究［D］. 邯郸：河北工程大学，2020.

[5] ZHOU J H，ZHOU F，WANG W X，et al. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China［J］. Hepatology，2020，71（5）：1851-1864. DOI：10.1002/hep.31150.

[6] FRIEDMAN S L，NEUSCHWANDER-TETRI B A，RINELLA M，et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies［J］. Nat Med，2018，24（7）：908-922. DOI：10.1038/s41591-018-0104-9.

[7] YOUNOSSI Z，ANSTEE Q M，MARIETTI M，et al. Global burden of NAFLD and NASH：trends，predictions，risk factors and prevention［J］. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2018，15（1）：11-20. DOI：10.1038/nrgastro.2017.109.

[8] ESLAM M，FAN J G，MENDEZ-SANCHEZ N. Non-alcoholic fatty liver disease in non-obese individuals：the impact of metabolic health［J］. Lancet Gastroenterol Hepatol，2020，5（8）：713-715. DOI：10.1016/S2468-1253（20）30090-X.

[9] KANWAL F，SHUBROOK J H，YOUNOSSI Z，et al. Preparing for the NASH epidemic：a call to action［J］. Metabolism，2021，122：154822. DOI：10.1016/j.metabol.2021.154822.

[10] SHEKA A C，ADEYI O，THOMPSON J，et al. Nonalcoholic steatohepatitis：a review［J］. JAMA，2020，323（12）：1175-1183. DOI：10.1001/jama.2020.2298.

[11] YOUNOSSI Z，ANSTEE Q M，MARIETTI M，et al. Global burden of NAFLD and NASH：trends，predictions，risk factors and prevention［J］. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2018，15（1）：11-20. DOI：10.1038/nrgastro.2017.109.

[12] 陈词. 冯琴：降糖减肥新秀——司美格鲁肽［J］. 肝博士，2022（3）：26-27.

[13] AHMANN A J，CAPEHORN M，CHARPENTIER G，et al. Efficacy and safety of once-weekly semaglutide versus exenatide ER in subjects with type 2 diabetes（SUSTAIN 3）：a 56-week，open-label，randomized clinical trial［J］. Diabetes Care，2018，41（2）：258-266. DOI：10.2337/dc17-0417.

[14] NIU S，CHEN S C，CHEN X，et al. Semaglutide ameliorates metabolism and hepatic outcomes in an NAFLD mouse model［J］. Front Endocrinol，2022，13：1046130. DOI：10.3389/fendo.2022.1046130.

[15] BUCHEIT J D，PAMULAPATI L G，CARTER N，et al. Oral semaglutide：a review of the first oral glucagon-like peptide 1 receptor agonist［J］. Diabetes Technol Ther，2020，22（1）：10-18. DOI：10.1089/dia.2019.0185.

[16] CHRISTOU G A，KATSIKI N，BLUNDELL J，et al. Semaglutide as a promising antiobesity drug［J］. Obes Rev，2019，20（6）：805-815. DOI：10.1111/obr.12839.

[17] LOOMBA R，ABDELMALEK M F，ARMSTRONG M J，et al. Semaglutide 2·4 Mg once weekly in patients with non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis：a randomised，placebo-controlled phase 2 trial［J］. Lancet Gastroenterol Hepatol，2023，8（6）：511-522. DOI：10.1016/S2468-1253（23）00068-7.

[18] SUMIDA Y，YONEDA M. Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH［J］. J Gastroenterol，2018，53（3）：362-376. DOI：10.1007/s00535-017-1415-1.

[19] BYRNE C D，TARGHER G. NAFLD：a multisystem disease［J］. J Hepatol，2015，62（1 Suppl）：S47-S64. DOI：10.1016/j.jhep.2014.12.012.

[20] WANG F S，FAN J G，ZHANG Z，et al. The global burden of liver disease：the major impact of China［J］. Hepatology，2014，60（6）：2099-2108. DOI：10.1002/hep.27406.

[21] COSMI F，LAINI R，NICOLUCCI A. Semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes［J］. N Engl J Med，2017，376（9）：890. DOI：10.1056/nejmc1615712.

[22] PEVERILL W，POWELL L W，SKOIEN R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH：beyond steatosis and inflammation［J］. Int J Mol Sci，2014，15（5）：8591-8638. DOI：10.3390/ijms15058591.

[23] FRIEDMAN S L，NEUSCHWANDER-TETRI B A，RINELLA M，et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies［J］. Nat Med，2018，24（7）：908-922. DOI：10.1038/s41591-018-0104-9.

[24] BERLANGA A，GUIU-JURADO E，PORRAS J A，et al. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease［J］. Clin Exp Gastroenterol，2014，7：221-239. DOI：10.2147/CEG.S62831.

[25] IPSEN D H，LYKKESFELDT J，TVEDEN-NYBORG P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver



disease［J］. Cell Mol Life Sci，2018，75（18）：3313-3327. DOI：10.1007/s00018-018-2860-6.
［26］RADA P，GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ Á，GARCÍA-MONZÓN C，et al. Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis：is CD36 a key driver?［J］. Cell Death Dis，2020，11（9）：802. DOI：10.1038/s41419-020-03003-w.
［27］ANSTEE Q M，GOLDIN R D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research［J］. Int J Exp Pathol，2006，87（1）：1-16. DOI：10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x.
［28］杨海琳，张定棋，陈高峰，等. 蛋氨酸-胆碱缺乏饮食诱导代谢相关脂肪肝模型小鼠血清和肝脏胆汁酸谱的变化［J］. 中国组织工程研究，2021，25（26）：4137-4144.
［29］GYAMFI M A，DAMJANOV I，FRENCH S，et al. The pathogenesis of ethanol versus methionine and choline deficient diet-induced liver injury［J］. Biochem Pharmacol，2008，75（4）：981-995. DOI：10.1016/j.bcp.2007.09.030.
［30］王端，马文君，姚远涛，等. 饮食治疗与抗氧化膳食补充剂对非酒精性脂肪性肝病的效果评价［J］. 中国全科医学，2021，24（11）：1383-1389. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2021.00.412.
［31］SMITS M M，TONNEIJCK L，MUSKIET M H，et al. Gastrointestinal actions of glucagon-like peptide-1-based therapies：glycaemic control beyond the pancreas［J］. Diabetes Obes Metab，2016，18（3）：224-235. DOI：10.1111/dom.12593.
［32］HUSSEIN H，ZACCARDI F，KHUNTI K，et al. Efficacy and tolerability of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors and glucagon-like peptide-1 receptor agonists：a systematic review and network meta-analysis［J］. Diabetes Obes Metab，2020，22（7）：1035-1046. DOI：10.1111/dom.14008.
［33］BIFARI F，MANFRINI R，DEI CAS M，et al. Multiple target tissue effects of GLP-1 analogues on non-alcoholic fatty liver disease（NAFLD）and non-alcoholic steatohepatitis（NASH）［J］. Pharmacol Res，2018，137：219-229. DOI：10.1016/j.phrs.2018.09.025.
［34］NEWSOME P N，BUCHHOLTZ K，CUSI K，et al. A placebo-controlled trial of subcutaneous semaglutide in nonalcoholic steatohepatitis［J］. N Engl J Med，2021，384（12）：1113-1124. DOI：10.1056/NEJMoa2028395.
［35］PONTES-DA-SILVA R M，DE SOUZA MARINHO T，DE MACEDO CARDOSO L E，et al. Obese mice weight loss role on nonalcoholic fatty liver disease and endoplasmic reticulum stress treated by a GLP-1 receptor agonist［J］. Int J Obes，2022，46（1）：21-29. DOI：10.1038/s41366-021-00955-7.
［36］张艳艳，赵蕾，谢云霞，等. FAT/CD36 在高脂喂养小鼠脂肪组织炎症中的作用［J］. 中国病理生理杂志，2015，31（3）：463-467. DOI：10.3969/j.issn.1000-4718.2015.03.014.
［37］KAZANTZIS M，STAHL A. Fatty acid transport proteins，implications in physiology and disease［J］. Biochim Biophys Acta，2012，1821（5）：852-857. DOI：10.1016/j.bbalip.2011.09.010.
［38］张艳艳. CD36 在高脂诱导的小鼠脂肪组织代谢性炎症中的作用［D］. 重庆：重庆医科大学.
［39］薄俊霞，李敬达，刘庆平. 脂肪酸移位酶 FAT/CD36 与长链脂肪酸的结合机制［J］. 中国动脉硬化杂志，2018，26（1）：25-28.
［40］ZENG S，WU F，CHEN M Y，et al. Inhibition of fatty acid translocase（FAT/CD36）palmitoylation enhances hepatic fatty acid β-oxidation by increasing its localization to mitochondria and interaction with long-chain acyl-CoA synthetase 1［J］. Antioxid Redox Signal，2022，36（16/17/18）：1081-1100. DOI：10.1089/ars.2021.0157.
［41］曾术. 肝脏 FAT/CD36 蛋白棕榈酰化修饰对其在线粒体定位和功能的影响［D］. 重庆：重庆医科大学，2022.
［42］HARDIE D G，ROSS F A，HAWLEY S A. AMPK：a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis［J］. Nat Rev Mol Cell Biol，2012，13（4）：251-262. DOI：10.1038/nrm3311.
［43］REIS-BARBOSA P H，MARCONDES-DE-CASTRO I A，MARINHO T S，et al. The mTORC1/AMPK pathway plays a role in the beneficial effects of semaglutide（GLP-1 receptor agonist）on the liver of obese mice［J］. Clin Res Hepatol Gastroenterol，2022，46（6）：101922. DOI：10.1016/j.clinre.2022.101922.
［44］DENG X Q，CHEN L L，LI N X. The expression of SIRT1 in nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats［J］. Liver Int，2007，27（5）：708-715. DOI：10.1111/j.1478-3231.2007.01497.x.
［45］LI H L，MIN Q，OUYANG C H，et al. AMPK activation prevents excess nutrient-induced hepatic lipid accumulation by inhibiting mTORC1 signaling and endoplasmic reticulum stress response［J］. Biochim Biophys Acta，2014，1842（9）：1844-1854. DOI：10.1016/j.bbadis.2014.07.002.
［46］ZHANG P F，CHENG X Y，SUN H M，et al. Atractyloside protect mice against liver steatosis by activation of autophagy via ANT-AMPK-mTORC1 signaling pathway［J］. Front Pharmacol，2021，12：736655. DOI：10.3389/fphar.2021.736655.
［47］SAMOVSKI D，SUN J Y，PIETKA T，et al. Regulation of AMPK activation by CD36 links fatty acid uptake to β-oxidation［J］. Diabetes，2015，64（2）：353-359. DOI：10.2337/db14-0582.
［48］王川. 高脂及炎症状态激活 mTOR 信号通路导致肝脏 CD36 翻译效率升高［D］. 重庆：重庆医科大学，2014.
［49］ZHANG C Y，TAN X H，YANG H H，et al. COX-2/sEH dual inhibitor alleviates hepatocyte senescence in NAFLD mice by restoring autophagy through Sirt1/PI3K/AKT/mTOR［J］. Int J Mol Sci，2022，23（15）：8267. DOI：10.3390/ijms23158267.
［50］刘炳霄，杨林. CD36 调控脂质代谢作用及机制［J］. 生物信息学，2023，21（2）：87-95. DOI：10.12113/202205003.

（收稿日期：2023-07-03；修回日期：2023-12-15）
（本文编辑：邹琳）